



西太平洋“暖池”海床深部沉积物中的细菌类群

赵晶, 曾润颖*

厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005;

国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005

* 联系人, E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-11-06; 接受日期: 2008-01-09

国家重点基础研究专项经费(批准号: G2000078500), 中国大洋协会项目(批准号: DY105-4-2-4)资助

摘要 通过 16S rDNA 克隆文库构建、PCR-RFLP 分析等方法, 对西太平洋“暖池”区海床以下 230 cm 深度的沉积物中的细菌类群组成进行了分析。结果表明该海区深部沉积物中的细菌类群主要包括 α -变形菌 (*Proteobacteria*), β -变形菌、CFB 类群 (*Cytophaga/Flexibacteria/Bacteroides*)、酸杆菌 (*Acidobacteria*) 和革兰氏阳性菌等, 各个类群的菌属组成均较为简单。其中 α -变形菌为最优势菌群, β -变形菌为次优势菌群, 它们的优势菌种分别为少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 和产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*)。CFB 类群中的细菌种类较为单一, 主要为黄杆菌属 (*Flavobacterium*)。革兰氏阳性菌在该深度沉积物中的数量也较多, 主要为地芽孢杆菌属 (*Geobacillus*)。对细菌类群的分析表明西太平洋“暖池”区该深度的沉积物中仍然存在较为丰富的有机物质, 而这些深部生物圈中的细菌在“暖池”区海底沉积物环境的氮循环中可能起着重要的作用。

关键词

西太平洋“暖池”
深部沉积物
细菌类群

海床以下沉积物中微生物的总生物量约占地球总生物量的 1/10 到 1/3^[1]。这些微生物多样性极其丰富, 它们参与了深部生物圈中的各种生物地球化学过程^[2,3]。在大部分深海沉积物, 尤其是“热泉喷口”(hydrothermal vents)和“冷泉”(cold seep)等一些特殊海区海底 1.5 m 以下的深层沉积物中, 硫酸盐还原和甲烷的产生与氧化被认为是主要的代谢过程^[4]。产甲烷古菌^[5-8]、硫酸盐还原菌^[4,9,10]等相关微生物的代谢活动及其物质能量转化过程成为研究的焦点^[4,11]。而在深部生物圈中, 微生物所参与的有机碳、氮、硫化物、甲烷等代谢活动之间是紧密联系的^[2,12,13], 而且这些活动可能直接影响着海洋、气候和地球表层环境的变化^[4,14], 是全面了解地球系统变化的一个重要环节, 因此对深海深部沉积物中的微生物群落结构

多样性进行研究是全面了解整个物质能量代谢过程的一个关键环节, 但目前这方面的研究仍较为缺乏。

西太平洋“暖池”位于从太平洋西部到印度洋东部的赤道两侧, 现代海气相互作用的研究证明该海区是全球气候系统的“引擎”^[15-17]。同时, 该海区也是生物类群较多, 代谢旺盛, 物质循环较快的海区, 因此对“暖池”区海底深部生物圈中的微生物多样性进行研究将有助于从沉积物圈、水圈、气圈及生物圈等圈层相互作用的角度全面了解“暖池”区在全球气候变化中的作用。本文对“暖池”区海床以下 230 cm 的深部沉积物进行了细菌类群的分析, 并与同一海区相邻站位的浅层沉积物中的细菌多样性进行比较^[18], 同时对它们所处环境的特征进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 样品来源

沉积物于2001年10~11月间采集自西太平洋“暖池”海域(WP0104 站位, 8°53'08"N, 142°59'51"E, 水深2068 m), 用重力柱采集, 柱长230 cm, 样品为浅灰白色有孔虫软泥。样品采集后从重力柱底部取长度为3 cm的沉积物, 立即在超净台中去除表层, 于-20℃条件下保存带回实验室, 并在超净台内再次切除表层后取样品的中心部分进行下一步实验。

1.2 沉积物中细菌 16S rDNA 文库的构建及 RFLP 分析

参照文献[18]中化学裂解和酶解相结合的方法提取沉积物中微生物宏基因组DNA, 并利用DNA吸附树脂进行纯化。细菌16S rRNA基因的PCR扩增采用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行。RFLP分析采用*Rsa*I(GT²AC)和*Msp*I(C²CGG)酶进行。各代表性克隆序列的测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。将所测定的16S rDNA序列与EMBL(European Molecular Biology Laboratory, <http://www.ebi.ac.uk>)和RDP II (Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu>)2个数据库中的已知序列进行相似性比较。系统发育分析采用邻接法(Neighbour-Joining)进行。

2 结果

2.1 细菌 16S rDNA 克隆文库分析

从所构建的16S rDNA克隆文库中随机挑取150个克隆, 经菌落PCR验证后得到95个阳性克隆。经RFLP分析后, 得到28个不同的谱型, 其中21个谱型由单一的克隆产生。以覆盖率(C)来评估所构建的文库对环境微生物多样性的覆盖程度, 计算公式为: $C = [1 - (n_1/N)] \times 100\%$, 其中, N 代表所分析的克隆数, n_1 代表具有不重复序列的克隆数^[19]。经计算, 所构建的16S rDNA克隆文库的覆盖率为77.9%, 能够反映出样品中主要细菌类群的多样性。

2.2 海底深部沉积物中细菌类群及系统发育分析

将所测定的28个16S rDNA序列与数据库中的

序列进行同源性比较分析, 结果见表1。该沉积物样品中存在多样性较为丰富的细菌群落, 包括变形菌(*Proteobacteria*), 革兰氏阳性菌、CFB类群(*Cytophaga/Flexibacteria/Bacteroides*)、酸杆菌(*Acidobacteria*), 和一个未知的细菌。但是每个类群的菌属组成均较为简单。

变形菌是该深度沉积物中最主要的细菌类群, 但是仅包含2个亚群。有50%(14/28)的基因型属于 α -变形菌, 其中9个基因型彼此之间的同源性较高(96%~98%之间), 而且与鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)的同源性在96%以上, 为同一菌属(图1), 该属细菌因能以多环芳烃(PAH)作为唯一的碳源和能源而广泛存在于各种被污染的环境中^[20,21]。在该菌属中, 有6个基因型与少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)的同源性最高, 达到98%以上。有21.4%(6/28)的基因型属于 β -变形菌, 形成了该深度沉积物中特有的次优势菌群。其中基因型G211(7个克隆)与一株以Fe²⁺为电子供体的厌氧反硝化细菌具有99.1%的同源性。4个不同的基因型: G12, G21, G37和G65(共12个克隆)分别与产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)具有96.8%~99.8%的同源性。这些菌属所具备的脱氮作用与环境的氮循环密切相关^[22,23]。

γ -变形菌可利用的营养物质范围较广, 在深海各种环境中, γ -变形菌也都是优势的类群^[18,24~26]。而值得注意的是, 本文没有检测到属于 γ -变形菌的克隆, 说明它们在该深度沉积物中所占比例很小。可能原因是该深度沉积物中的物质组成较为单一, 适合该亚群细菌生长的营养物质类型较少。

除了变形菌群以外, 属于革兰氏阳性菌和CFB类群的细菌也占据了较大比例(均为10%左右), 为该样品中的主要细菌类群。但它们的菌属组成都较为单一, 革兰氏阳性菌中主要是地芽孢杆菌属(*Geobacillus*), CFB类群中主要为黄杆菌属(*Flavobacterium*), 另外还有少量的鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)。有4个基因型(G76, G4, G173, G6)无法在数据库中找到明确的菌属, 属于未知的新菌种。

表 1 WP0104 站位沉积物(230 cm)中细菌 16S rDNA 克隆所属类群分布

细菌类群	不同基因型克隆编号	克隆数	数据库中同源性最高的细菌	同源性/%
<i>α-proteobacteria</i>	G5	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98.08
	G70	16	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98.81
	G234	20	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98.88
	G73	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98.19
	G80	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.09
	G157	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98.37
	G61	1	<i>Sphingomonas</i> sp.	96.75
	G208	1	<i>Sphingomonas</i> sp.	98.96
	G236	1	<i>Sphingomonas</i> sp.	97.31
	G83	1	<i>Dyadobacter fermentens</i>	98.40
	G177	1	<i>Dyadobacter fermentens</i>	97.42
	G226	1	<i>Dyadobacter fermentens</i>	98.05
	G6	1	Uncultured bacterium DSSD40	96.64
	G14	1	<i>Rhodobacteraceae</i> sp.	96.32
<i>β-proteobacteria</i>	G12	1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	99.26
	G21	9	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	98.79
	G37	1	<i>Pseudomonas alkaligenes</i>	97.26
	G65	1	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	96.80
	G211	7	Denitrifying Fe-oxidizing bacteria	97.03
	G189	1	<i>Ralstonia eutropha</i>	93.86
Gram-positive	G64	9	<i>Geobacillus</i> sp.	95.45
	G76	1	Uncultured candidate division OP3 bacterium	89.15
	G173	1	Uncultured soil bacterium	97.36
CFB Group	G24	1	<i>Sphingobacterium</i> sp. TUT102	96.85
	G62	1	<i>Sphingobacterium</i> sp. TUT102	97.52
	G26	8	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp.	94.76
<i>Acidobacteria</i>	G174	5	Uncultured <i>Acidobacter</i> sp.	97.39
Unknown	G4	1	Uncultured soil bacterium	90.42

3 讨论

3.1 西太平洋“暖池”区不同深度沉积物中的细菌多样性差异

在以往的工作中,我们对同样位于西太平洋“暖池”区的邻近站点 WP0102(7°59'24"N, 142°30'00"E, 水深 1901 m)的浅层沉积物(0~12 cm)中的微生物多样性进行了分析^[18]. 将两者进行比较,发现这两个样品中的细菌类群组成有着明显的差异(图 2). (1) 虽然变形菌在 2 个沉积物样品中都处于绝对优势的地位,但其亚群组成完全不同. 与浅层沉积物相比,在本文所研究的深层沉积物中仅检测到 α -和 β -两个亚群,它们在细菌类群中所占的比例均比浅层中的高,尤其是 β -亚群在浅层沉积物中十分稀少,而在深层沉积物

中则是次优势类群. 除了这两个亚群以外,在深层沉积物中没有检测到 γ -, δ -, ϵ -亚群的细菌,而这三个亚群的细菌在浅层沉积物中广泛存在,其中 γ -亚群更是占据绝对优势^[18]. (2) 革兰氏阳性菌在深层沉积物中所占的比例远比浅层中高; CFB 类群的细菌在深层沉积物中含量较少,而且种类较为单一. (3) 浅层沉积物中的细菌多样性明显比深层沉积物中更加丰富,各个细菌类群中所检测到的菌属都较多.

空间隔离和营养源差异是造成表层和深层土壤、沉积物环境中微生物群落结构多样性的主要因素^[27~29]. 在本文中,造成这种细菌类群差异的原因主要有两点: (1) 两者之间的深度相差为 218 cm,在深层海底沉积物中,生物扰动和相互混合作用对微生物生态系统的影响极小^[30],这种相对稳定的环境条

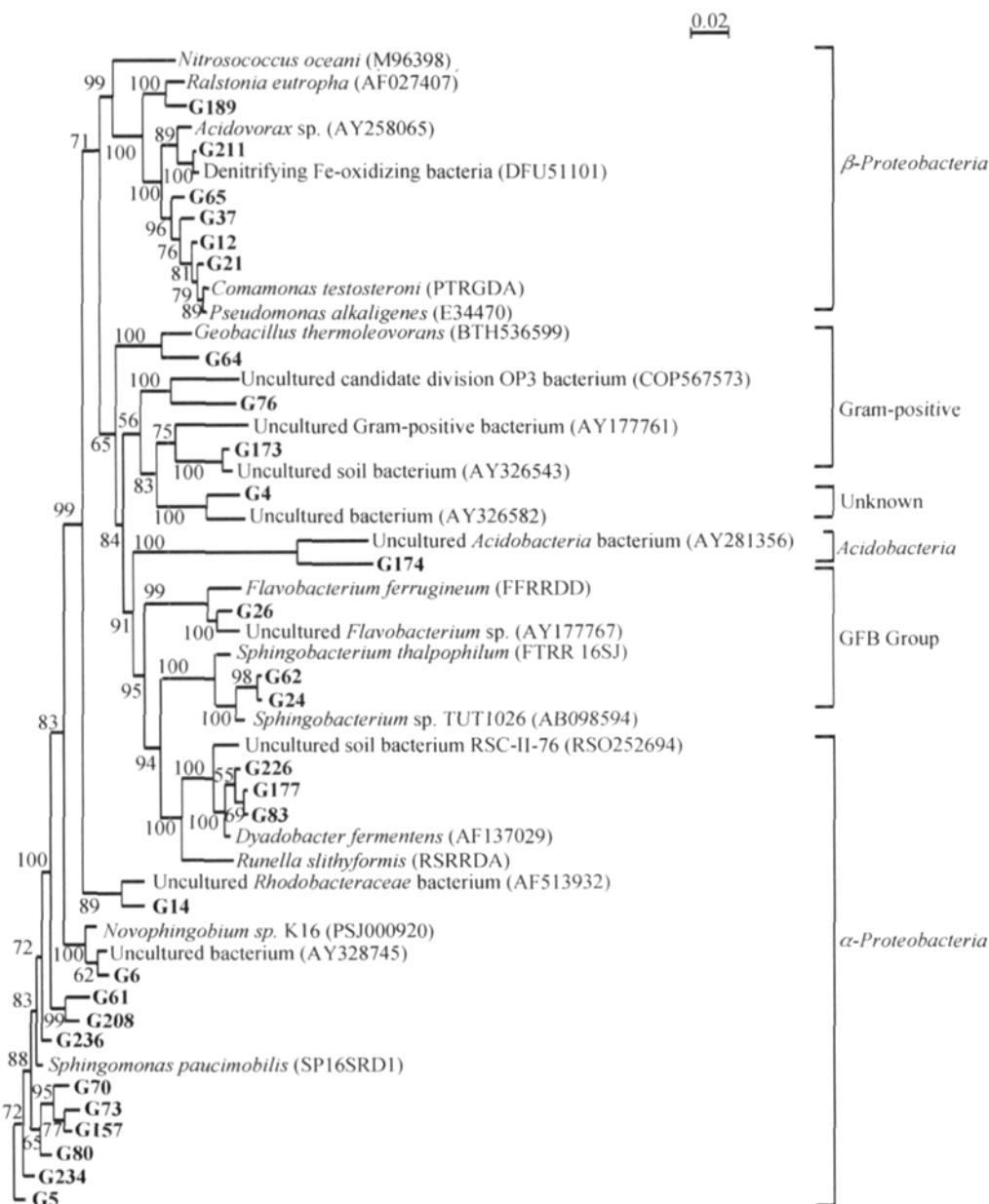


图1 WP0104 站位沉积物中细菌的系统发育树

本研究中的克隆用黑体表示; 参照菌株引自 EMBL 数据库, 括号内为该菌株在数据库中的编号

件造成了特殊的微生物类群。(2) 不同深度的沉积物之间有机、无机物质的含量和类型的差别也是造成不同微生物类群的重要原因。

3.2 “暖池”区海底深层沉积物中细菌类群组成特征与环境的关系

有机质和氧、硫酸盐和硝酸盐等氧化剂从上层海水进入沉积物, 然后在一系列由微生物参与的代谢

反应中逐步消耗。这些物质的消耗过程表现为竞争关系, 那些能提供最大自由能的物质率先被消耗^[31], 因此不同深度的沉积物中的微生物群落结构反映了该层次中能量物质的分布特征, 包括浓度和种类等。

在全球海洋沉积物中的硫酸盐(SO_4^{2-})还原和甲烷产生等过程中都有微生物的参与^[4], 其中 SO_4^{2-} 在沉积物中的浓度随着沉积物深度的增加而减少^[32],

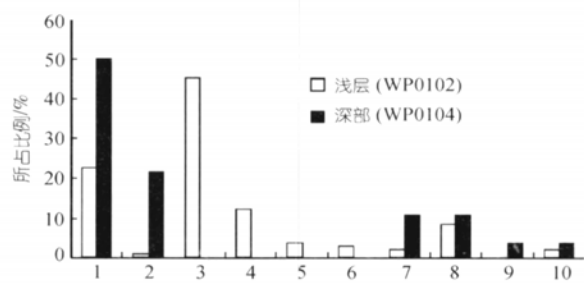


图 2 西太平洋“暖池”区不同深度的沉积物中各细菌类群所占比例比较

1. α -Proteobacteria, 2. β -Proteobacteria, 3. γ -Proteobacteria, 4. δ -Proteobacteria, 5. ϵ -Proteobacteria, 6. 浮霉状菌(Planctomycete), 7. Grampositive, 8. CFB 组, 9. Acidobacteria, 10. 其他

在大洋边缘海域的沉积物中硫酸盐的消耗较快, 在海床以下几十米就已经被完全消耗, 例如 ODP798^[4], 1230[#]和 1227[#]^[33] 站位. SO_4^{2-} 的消耗在很大程度上受到沉积下来的有机质数量和种类的控制, 有机质的增加导致 SO_4^{2-} 的消耗的加速 ($2(\text{CH}_2\text{O}) + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{S}$)^[32,34,35]. 我们在“暖池”区浅层沉积物中发现了数量和多样性均较为丰富的 γ -变形菌群和 CFB 类群细菌, 它们都主要生活在有机物质较为丰富的环境中^[36,37], 说明在浅层沉积物中有机质的类型及含量均更为丰富. 而硫酸盐还原菌和甲烷氧化菌这两类细菌在浅层沉积物中含量丰富, 在 230 cm 深度的深层沉积物中却没有被检出(表 1), 这些结果从微生物的角度上说明了“暖池”区海底沉积物中较高的有机质含量加快了 SO_4^{2-} 在浅层沉积物中的消耗, 同时也促进了与之相耦联的甲烷氧化反应的进行. 这些反应的产物, 例如 H_2S , CO_2 除了继续参与其它物质的代谢以外, 从沉积物中释放出来的这些气体也可能成为影响上层海水的一个因素.

深层沉积物中的主要细菌类群为 α -和 β -变形菌, 它们分别是最优势和次优势的菌群. α -变形菌亚群的细菌普遍存在于深海环境中, 其所包含的菌属大部分是具有固氮作用或利用硝酸盐、亚硝酸盐能力的细菌^[24,26,38], 其中鞘氨醇单胞菌属由于具有分解有机物的代谢特性而广泛分布于富含有机物的环境^[20,21,39], 包括深海沉积物^[40,41]中, 被认为是土壤生物降解中重要的生物催化剂. 在实验中发现多达 89.6%(43/48)

属于 α -变形菌的克隆为鞘氨醇单胞菌属, 说明在该深层沉积物中仍存在着较高浓度的有机质. 而我们采用高温燃烧催化氧化-非分散红外吸收(NDIR)法(TOC-VCPN, 岛津公司)测定的结果也证实了这一点: 在该站位 12 cm 以上沉积物中有机碳的含量平均为 3.69%(箱式采样, 取样分 3 cm 一层, 4~6 cm 层次最高, 为 4.05%), 而该文所研究的深部样品中有机碳含量为 3.52%, 二者相差不大. 这些有机质可能是由表层沉积物渗透并累积下来的. 另一方面, 在“暖池”区深层沉积物样品中, β -变形菌中的大部分细菌均与脱氮铁氧化细菌(Denitrifying Fe-oxidizing bacteria)和产碱假单胞菌具有很高的同源性, 为相同菌属, 它们与氮代谢密切相关^[22,23]. 曾有报道认为, β -变形菌中的绝大部分细菌存在于包括南北极湖泊在内的一些淡水生态系统中^[42~44], 而在海水生态系统中都尚未发现其大量存在. 我们在浅层沉积物中也仅发现了一个属于 β -变形菌的克隆^[18]. 但后来的研究表明 β -变形菌中与氮代谢有关的细菌实际上是海底沉积物菌系的主要成员^[45]. 这种细菌类群组成的差异表明在该“暖池”深层样品中氮的代谢比浅层旺盛.

以往研究报道^[30,46,47]以及我们对浅层沉积物的分析结果^[18]都表明包括“暖池”区在内的深海浅层沉积物中硫化物的氧化还原、氮的固定、甲烷的氧化等作用过程相当活跃, 而本文所发现的细菌类群说明氮的代谢在“暖池”区深层沉积物中较为活跃, 因此西太平洋“暖池”区沉积物中丰富的细菌类群在由浅到深的整个沉积物环境中的硫、碳、氮循环中起着重要的作用.

WP0104 样品来自深海海床以下 230 cm, 在此深度的海底沉积物中, 微生物生态系统基本不受生物扰动和相互混合作用的影响^[30]. 我们在该样品中发现的这些细菌类群中大部分为厌氧代谢的细菌, 但是也包括一些需氧代谢的细菌, 渗透作用为它们提供了所需的营养物质和氧气, 同时也说明深海沉积物的环境并不是单一的, 它由许多条件不同的微环境组成. 而尽管来源不同, 但各类菌群已从遗传特性、生理代谢等各方面长期适应了这些微环境并繁衍生息, 从而形成了与环境相互协调的特殊的微生物群落.

参考文献

- 1 Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6578—6583
- 2 Jorgensen B B, Boetius A. Feast and famine——microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 770—781
- 3 Heijs S K, Haese R R, Wielen P W J J, et al. Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microb Ecol*, 2007, 53: 384—398
- 4 D'Hondt S, Rutherford S, Spivack A J. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, 2002, 295: 2067—2070
- 5 Inagaki F, Takai K, Komatsu T, et al. Archaeology of Archaea: geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea subseafloor environment. *Extremophiles*, 2001, 5: 385—392
- 6 Marchesi J R, Weightman A J, Cragg B A, et al. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 34: 221—228
- 7 Newberry C J, Webster G, Cragg B A, et al. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environ Microbiol*, 2004, 6: 274—287
- 8 Takishita K, Yubuki N, Kakizoe N, et al. Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures. *Extremophiles*, 2007, 11: 563—576
- 9 van der Wielen P W, Heijs S K. Sulfate-reducing prokaryotic communities in two deep hypersaline anoxic basins in the Eastern Mediterranean deep sea. *Environ Microbiol*, 2007, 9: 1335—1340
- 10 Leloup J, Loy A, Knab N J, et al. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ Microbiol*, 2007, 9: 131—142
- 11 Wellsbury P, Goodman K, Barth T, et al. Deep marine biosphere fueled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature*, 1997, 388: 573—576
- 12 Hallam S J, Putnam N, Preston C M, et al. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 2004, 305: 1457—1462
- 13 McCollom T M, Seewald J S. Abiotic synthesis of organic compounds in deep-sea hydrothermal environments. *Chem Rev*, 2007, 107: 382—401
- 14 Dickens G. On the fate of past gas: what happens to methane released from a bacterially mediated gas hydrate capacitor? *Geochem Geophys Geosys*, 2001, 2: 2000GC000131
- 15 Partin J W, Cobb K M, Adkins J F, et al. Millennial-scale trends in west Pacific warm pool hydrology since the Last Glacial Maximum. *Nature*, 2007, 449: 452—455
- 16 Medina-Elizalde M, Lea D W. The mid-Pleistocene transition in the tropical Pacific. *Science*, 2005, 310: 1009—1012
- 17 de Garidel-Thoron T, Rosenthal Y, Bassinot F, et al. Stable sea surface temperatures in the western Pacific warm pool over the past 1.75 million years. *Nature*, 2005, 433: 294—298
- 18 曾润颖, 赵晶, 张锐, 等. 西太平洋暖池区沉积物中的细菌类群及其与环境的关系. *中国科学 D 辑: 地球科学*, 2004, 34(3): 265—271
- 19 Giovannoni S J, Mullins T D, Field K G. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes. In: Joint I, ed. *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*. NATO ASI Series, Vol. G38. Berlin: Springer-Verlag Press, 1995. 217—248
- 20 Leys N M, Ryngaert A, Bastiaens L, et al. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1944—1955
- 21 Dogra C, Raina V, Pal R, et al. Organization of *lin* genes and IS6100 among different strains of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas paucimobilis*: evidence for horizontal gene transfer. *J Bacteriol*, 2004, 186: 2225—2235
- 22 Sofia A, Liu W T, Ong S L, et al. In-situ characterization of microbial community in an A/O submerged membrane bioreactor with nitrogen removal. *Water Sci Technol*, 2004, 50: 41—48
- 23 Van de Pas-Schoonen K T, Schalk-Otte S, Haaijer S, et al. Complete conversion of nitrate into dinitrogen gas in co-cultures of denitrifying bacteria. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 205—209
- 24 Heijs S K, Aloisi G, Bouloubassi I, et al. Microbial community structure in three deep-sea carbonate crusts. *Microb Ecol*, 2006, 52: 451—462

- 25 Nercessian O, Fouquet Y, Pierre C, et al. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol*, 2005, 7: 698—714
- 26 Inagaki F, Suzuki M, Takai K, et al. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of okhotsk. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7224—7235
- 27 Zhou J, Xia B, Treves D S, et al. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 326—334
- 28 Zhou J, Xia B, Huang H, et al. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1723—1734
- 29 Treves D S, Xia B, Zhou J, et al. A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. *Microb Ecol*, 2003, 45: 20—28
- 30 Mortimer R J G, Krom M D, Harris S J, et al. Evidence for suboxic nitrification in recent marine sediments. *Mar Ecol Progress Series*, 2002, 236: 31—35
- 31 DeLong E F. Microbiology. Microbial life breathes deep. *Science*, 2004, 306: 2198—2200
- 32 Borowski W S, Paull P K, Ussler W I. Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: sensitivity to underlying methane and gas hydrates. *Mar Geol*, 1999, 159: 131—154
- 33 D'Hondt S, Jorgensen B B, Miller D J, et al. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science*, 2004, 306: 2216—2221
- 34 Thamdrup B, Canfield D E. Pathways of carbon oxidation in continental margin sediments off central Chile. *Limnol Oceanogr*, 1996, 41: 1629—1650
- 35 Takii S. Amino acids as main substrates for sulfate-reducing bacteria in surface sediment of a eutrophic bay. *J Gen Appl Microbiol*, 2003, 49: 329—336
- 36 Rossello-Mora R, Thamdrup B, Schafer H, et al. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst Appl Microbiol*, 1999, 22: 237—248
- 37 O'Sullivan L A, Weightman A J, Fry J C. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 201—210
- 38 Inagaki F, Suzuki M, Takai K, et al. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of okhotsk. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7224—7235
- 39 Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, et al. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 1834—1843
- 40 Fredrickson J K, Balkwill D L, Romine M F, et al. Ecology, physiology, and phylogeny of deep subsurface *Sphingomonas* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, 23: 273—283
- 41 Fredrickson J K, Balkwill D L, Drake G R, et al. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1917—1922
- 42 Crump B C, Armbrust E V, Baross J A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3192—3204
- 43 张锐, 林念炜, 赵晶, 等. 南极阿德雷岛地表沉积物中细菌多样性及对环境的响应. *自然科学进展*, 2003, 13: 1067—1072
- 44 Crump B C, Kling G W, Bahr M, et al. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 2253—2268
- 45 Nold S C, Zhou J, Devol A H, et al. Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the Proteobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4532—4535
- 46 Brune A, Frenzel P, Cypionka H. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 691—710
- 47 Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1312—1318